第 44 卷 第 4 期
2001 年 11 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44，No.4
Nov.，2001

棉蚜微卫星 DNA 的克隆及其多态性检测

杨效文，张广学，陈晓峰
（中国科学院动物研究所，北京 100080）

关键词：棉蚜；微卫星；多态性检测
中图分类号：Q963 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2001）04-0586-04

微卫星 DNA（microsatellite DNA）是由 2～6 bp 核苷酸序列组成的简单串联重复序列，广泛存在于基因组的间隔顺序和内含子等非编码区。由于其高度的多态性，呈共显性遗传，并且其多态性可用 PCR 技术结合电泳被检测出来，且可克服 DNA 多位点方法（如 RAPD 及 DNA 指纹图等）中把来自不同位点但具有相同大小的等位基因混淆等优点，使其已成为生物群体遗传结构与变异及彼此关系研究中的一种极有价值的分子遗传标记工具。

棉蚜 *Aphis gossypii* 是一种重要的农业害虫，其寄主广，且季节分化明显。目前已记载的寄主有 75 科 285 种。张克斌[1]的寄主转接实验表明，不同冬寄主上越冬的棉蚜其夏寄主范围不同。Inaixumi 根据冬、夏寄主之间的转换将日本的棉蚜分为 4 个生物型[2]。而 Wool 等报道，在澳大利亚棉蚜虽然在不同寄主上存活率有变化，但没有绝对的寄主专化型[3]。汪世泽等就棉蚜体色变化提出了"季节生物型"的概念，将棉蚜分为苗蚜和伏蚜两个生物型[4]。赵惠燕等用实验生态学方法研究了棉蚜体色变化机理[5]。然而，关于棉蚜的许多基本问题尚不清楚，如棉蚜是否存在着寄主专化型，棉蚜苗蚜和小型蚜之间的遗传关系，棉蚜的种群分化与寄主转移之间的关系等。

构建棉蚜基因组 DNA 300～800 bp 的插入文库并从中筛选出棉蚜微卫星，通过检测微卫星的多态性或用微卫星作探针进行 DNA 指纹图对棉蚜种群分化进行研究，不仅具有重要的理论意义，而且具有很高的实践价值。

1 材料和方法

1.1 蚜虫样品的采集与保存

本研究所用蚜虫样品从田间采集后在室内相同寄主上隔离笼罩饲养 1～2 代，以排除寄生。将无翅孤雌成蚜采集于盛有无水乙醇的 1.5 mL 离心管，－20℃保存。

1.2 蚜虫基因组 DNA 提取

棉蚜群体基因组 DNA 的提取：将 30 头棉蚜装入 1.5 mL 离心管，置液氮中冷冻 10 min，取出捣碎后加入 1×STE 缓冲液 500 μL，10 mg/mL 蛋白酶 15μL，20% SDS 12.5μL，混匀后置于 55℃保温 8 h 以上。然后，依次用等体积的 Tris 饱和酚、酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇抽提，加入冰冷的无水乙醇 900 μL 和 3 mol/L 醋酸钠（pH 7.0）50 μL，混匀后置于－20℃ 0.5 h；12 000 r/min 离心，用 70% 乙醇洗涤一次，37℃干燥后，加入 TE（pH

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39630210）
收稿日期：1999-12-08；接受日期：2000-02-12

8.0）100 μL，室温下溶解 DNA。待 DNA 溶解后，加入 1 mg/mL 的 RNA 酶 20 μL 置于 37℃ 1 h。DNA 于 – 20℃保存待用。

单头棉蚜基因组 DNA 的提取：将单个蚜虫在 100 μL 提取缓冲液中（1% SDS，50 mmol/L Tris-Cl，pH 8.0，25 mmol/L NaCl，25 mmol/L EDTA）用牙签捣碎，65℃水浴 45 min 后，加入 100 μL 3 mol/L 醋酸钾，冰上放置 1 h，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇，混匀， – 20℃放置 1 h 以上，12 000 r/min 离心 20 min，用 70% 乙醇洗一次，在 37℃干燥后，加入 20 μL pH 8.0 TE，放入 55℃水浴 8 h 以上， – 20℃保存待用。

1.3　DNA 目的片段的制备及文库构建

将采自南京棉花上的绿色棉蚜的基因组 DNA（群体）用 *Hae* Ⅲ、*Alu* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ 三种酶 37℃酶切过夜，用冻溶法从 1% 琼脂糖胶上回收 300 ~ 800 bp 范围的片段。

质粒载体 pGEM-7Zf（ + / – ）用 *Sma* Ⅰ 酶切并纯化后，用 T4 DNA 连接酶将上述回收的棉蚜 DNA 片段插入载体的 *Sma* Ⅰ 位点，再转化到 JM109 感受态菌，经蓝白斑筛选，获得含有插入片段的重组子的文库。

1.4　分子杂交及文库筛选

提取重组子质粒 DNA（500 多个）后，加入 NaOH 和 EDTA 使二者的终浓度分别为 0.4 mol/L 和 10 mmol/L，100℃水浴变性 10 min，冰上 5 min，通过 Manifold 将样品点到正电荷的尼龙膜（Boehringer Mannheim 公司提供）上，用紫外交联仪（Bio-Rad 公司产）固定。用 DIG Oligonucleotide 3’-End Labeling Kit 试剂盒（Boehringer Mannheim 公司提供）标记合成的寡核苷酸（GA)$_8$、（GT）8 和（CAC）5（北京赛北盛生物工程公司合成）为探针，预杂交和杂交温度为 55℃。杂交完毕用 0.1（SSC（含 0.1% SDS）在 55℃洗膜 3 次，每次 20 min。化学发光检测基本按试剂盒说明书进行，化学发光底物用 CSPD 试剂。

1.5　DNA 序列测定

根据杂交结果，选择信号强的 14 个重组质粒进行插入片段序列测定（测序由北京赛百盛生物工程公司完成），其中的 12 个阳性克隆的重复序列的重复次数太少或难以设计引物，有两个阳性克隆含有较长的微卫星序列并可根据侧翼序列设计扩增引物。

1.6　微卫星位点多态性检测

分别用采自不同寄主植物（棉花、黄瓜、木槿、花椒、石榴、南瓜）及不同地区（南京、郑州、辽宁朝阳、陕西渭南和新疆温宿）棉花上的棉蚜进行 PCR 扩增来检测克隆到的两个微卫星位点的多态性。每个种群的棉蚜扩增 20 个个体。

扩增反应液含模板 DNA（稀释 5 倍的单头蚜虫基因组 DNA）3 μL，引物各 15 ng，dNTPs 5 mmol/L ，Taq 酶 1.5 单位，10 × buffer（含 Mg 离子），用双蒸水加至 25 μL ，加石蜡油 25 μL。

PCR 扩增在 PE9600 DNA 扩增仪上进行，扩增条件为 94℃ 5 min，接着为 35 个循环：94℃ 1 min，特定的退火温度（表 1）1 min，72℃ 2 min，最后在 72℃延伸 10 min。

扩增产物在 8% 的非变性的聚丙烯酰胺凝胶上电泳后，按 Cairns 等[6] 的方法进行银染后读带。等位基因的大小按以下方法确定：首先按 Kamau 等[7] 的方法对每一个位点制作等位基因大小梯度，然后参照梯度和 PhiX174 DNA/Hinf I Markers（Promega 公司提供）确定等位基因的大小和个数。

2　结果与分析

由表 1 可见，微卫星位点 CAM-4 上仅有 2 个等位基因，而微卫星位点 CAM-14 上可检测到 6 个等位基因。表 1 同时给出了两个微卫星位点的扩增引物、退火温度以及等位基因大小的变化范围。

表 2 表明，微卫星位点 CAM-4 在棉蚜的 7 个寄主种群中均可检测到 2 个等位基因，但其杂合率很低，多为纯合子。而微卫星位点 CAM-14 在棉蚜的 7 个寄主种群检测到的等位基因数有所不同。在棉蚜的鼠李和南瓜种群中可检测到 5 个等位基因，而在其余的寄主种群中则可检测到 4 个等位基因。

表1 棉蚜微卫星位点的扩增引物及扩增条件

Table 1 Primer sequences and PCR amplification conditions of the two microsatellite loci isolated from the field population of *Aphis gossypii*

微卫星位点 Locus	重复序列 Repeat motif	扩增引物（5′-3′） Primer sequences（5′-3′）	等位基因数 Number of alleles	片段大小（bp） Size range	退火温度（℃） Annealing temp
CAM-4	$(ATT)_6 \cdots (TA)_7$	F：ATCGGACCTAACCTAAAAGC	2	157～168	57
		R：ACTTTCTTTCTTTATCTCTA			
CAM-14	$(AC)_{19}AT(AC)_5$	F：TTCGCTTAGTTATAGCTGTC	6	160～195	67
		R：GTTACCCTCGACGATTGCGT			

表2 微卫星位点CAM-4和CAM-14在棉蚜种群中的多态性*

Table 2 Polymorphism of two microsatellite loci，CAM-4 and CAM-14，in the seven *Aphis gossypii* populations

棉蚜种群 Population	微卫星位点 Locus	等位基因数 Number of alleles	杂合率 Heterozygosity Obs.	杂合率 Heterozygosity Expt.	Hardy-Winberg *P*	Hardy-Winberg *P′*
木槿 hibiscus	CAM-14	4	0.8333	0.7174	0.2791	0.8402
	CAM-4	2	0.1000	0.5737	0.0069	0.0490
石榴 punica	CAM-14	4	0.9000	0.6486	0.0076	0.0601
	CAM-4	2	0.0500	0.5263	0.0049	0.0253
鼠李 rhamnus	CAM-14	5	0.9167	0.7246	0.0198	0.6004
	CAM-4	2	0.1000	0.5737	0.0069	0.0490
花椒 zanthoxylum	CAM-14	4	0.9091	0.7229	0.1904	0.3301
	CAM-4	2	0.0000	0.3750	0.0015	0.0105
黄瓜 cucumber	CAM-14	4	0.5833	0.4891	1.0000	1.0000
	CAM-4	2	0.0000	0.4550	0.0026	0.0134
棉花 cotton	CAM-14	4	0.5909	0.6753	0.4779	0.7229
	CAM-4	2	0.0500	0.5263	0.0049	0.0253
南瓜 pumpkin	CAM-14	5	0.7273	0.6926	0.8118	0.7091
	CAM-4	2	0.0000	0.4800	0.0029	0.0253

* *P* 是根据所有的基因型数据计算的结果，*P′* 则是根据一个蚜虫一个基因型数据的计算结果

P was calculated from full data，while *P′* was calculated from restricted data with one aphid per genotype within each host category

由于棉蚜种群在本研究的样品采集期间进行孤雌生殖，所以同一棉蚜克隆内的基因型的拷贝数将影响结果的分析和解释[8,9]（详见 Sunnucks *et al*.，1997；Simon *et al*.，1999）。因而在进行 Hardy-Winberg 检验时，我们既用了所有数据也用了一个蚜虫一个基因型数据，结果表明：CAM-4 位点均显著偏离 Hardy-Winberg 平衡，而 CAM-14 位点均符合 Hardy-Winberg 平衡。

3 讨论

微卫星标记是共显性的单位点遗传标记。多数情况下每个位点有多个等位基因且具有较高的杂合性，同时自然选择对其的影响较小[10～14]。微卫星标记的上述特点特别适合种群遗传研究，对同工酶变异较低的蚜虫类更是一种理想的标记方法[15]。

微卫星位点的多态性在分析物种进化[16]、生物群体内的遗传变异[17]以及种间关系[18]甚至生物个体鉴别等方面均已有成功的报道。Sunnucks 等用微卫星位点研究了澳大利亚麦长管蚜的种群遗传结构[8]，解释了该虫的周期性孤雌生殖、家系分化和寄主专化之间的遗传关系。本研究所得到的两个微卫星将为棉蚜的种群分

化研究提供一种有效的遗传标记方法。

参 考 文 献 （References）

［1］ 张克斌，刘惠霞，王玲莉. 棉蚜年生活周期及其与寄主营养的关系. 西北农业大学学报，1987，15（4）：15～21

［2］ Inaizumi M. Life cycle of *Aphis gossypii* Glover（Homoptera，Aphididae）with special reference to biotype differentiation on various host plants. Kontyu，1981，49（1）：219～240

［3］ Wool D，Hales D，Sunnucks P. Host plant relationships of *Aphis gossypii* Glover（Homoptera：Aphididae）in Australia. J. Austra. Entomol. Soc.，1995，34（3）：265～271

［4］ 汪世泽，赵惠燕，董应才. 棉蚜体色分化与季节生物型问题. 西北农学院学报，1983，2：9～23

［5］ 赵惠燕，张改生，汪世泽等. 棉蚜体色变化的生态遗传学研究. 昆虫学报，1993，36（3）：282～289

［6］ Cairns M J，Murray V. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques，1994，17：915～919

［7］ Kamau L，Mukabana W R，Hawley W A *et al*. Analysis of genetic variability in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* using microsatellite loci. Insect Mol. Biol.，1999，8：287～297

［8］ Sunnucks P，De Barro P J，Lushai G *et al*. Genetic structure of an aphid studied using microsatellites：cyclic parthenogenesis，differentiated lineages and host specialization. Mol. Ecol.，1997，6：1 059～1 073

［9］ Simon J C，Baumann S，Sunnucks P *et al*. Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid *Sitobion avenae* studied using phenotypic and microsatellite markers. Mol. Ecol.，1999，8：531～545

［10］ Bruford M W，Wayne R K. Microsatellites and their application to population genetic studies. Curr. Opin. Gen. Dev.，1993，3：939～943

［11］ Estoup A，Garnery L，Solignac M *et al*. Microsatellite variation in honey bee *Apis mellifera*（L.）populations：hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. Genetics，1995，140：679～695

［12］ Lanzaro G C，Zheng L，Toure Y T *et al*. Microsatellite DNA and isozyme variability in a West African population of *Anopheles gambiae*. Insect Mol. Biol.，1995，4：105～112

［13］ England P R，Briscoe D A，Frankham R. Microsatellite polymorphisms in a wild population of *Drosophila melanogaster*. Gen. Res.（Cambridge），1996，67：1～55

［14］ Jarne P，Lagoda J L. Microsatellites，from molecules to populations and back. Trend. Ecol. Evolut.，1996，11：424～429

［15］ Hales D F，Tomiuk J，Wohrmann K *et al*. Evolutionary and genetic aspects of aphid biology：a review. Europ. J. Ent.， 1997，94：1～55

［16］ Bancroft D R，Penmberton M，King P. Extensive protein and microsatellite variability in an isolated，cyclic ungulate population. Heredity，1995，74：326～336

［17］ Baruffi L，Damian G，Guglielmino C R *et al*. Polymorphism within and between population of *Cerant icapiata*：comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. Heredity，1995，74：425～437

［18］ Morin P A，Wallis J J，Moore D S *et al*. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. Mol. Ecol.，1994，3：469～478

Isolation and characterization of microsatellite loci from the cotton aphid *Aphis gossypii*

YANG Xiao-wen，ZHANG Guang-xue，CHEN Xiao-feng

（Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，Beijing 100080，China）